

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

**(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro**



**(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. September 2004 (30.09.2004)**

PCT

**(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/083364 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/002820

(22) Internationales Anmelde datum:
18. März 2004 (18.03.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 11 889.6 18. März 2003 (18.03.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): WOHLRAB, Johannes [DE/DE]; Schillerstrasse 57, 06114 Halle/S. (DE).

**(71) Anmelder und
(72) Erfinder:** WOHLRAB, David [DE/DE]; Mörikestrasse 13, 06118 Halle (DE).

(74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR; Mozartstrasse 17, 80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2004/083364 A2

(54) Title: CELL PREPARATION AND USE OF THE PREPARATION FOR TREATING JOINTS AND CARTILAGE DEFECTS, AND METHODS FOR THE PRODUCTION THEREOF

(54) Bezeichnung: ZELLPRÄPARAT UND VERWENDUNG DES PRÄPARATS ZUR BEHANDLUNG VON GELENKEN UND KNORPELDEFEKten, SOWIE VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to a cell preparation for therapeutic and/or cosmetic use in humans and/or animals, containing: a) human or animal cells, which; b) had been cultured while using a substance or substance mixtures that activate(s) CD44 expression of these cells, and which present an increased CD44 expression of these cells.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Zellpräparat zur therapeutischen und/oder kosmetischen Anwendung beim Menschen und/oder Tier enthaltend a) humane oder tierische Zellen die b) unter Zusatz einer CD44 Expression dieser Zellen aktivierenden Substanz bzw. Substanzgemischen kultiviert wurden und eine erhöhte CD44-Expression dieser Zellen vorliegt.

Zellpräparat und Verwendung des Präparats zur Behandlung von Gelenken und Knorpeldefekten, sowie Verfahren zur Herstellung

5 Die Erfindung betrifft neue intraartikulär, intradiscal, subcutan, intracutan oder epicutan (topisch) anwendbare Zellpräparate, welche humane oder tierische Zellen enthalten, welche unter Zusatz einer die CD44 Expression dieser Zellen aktivierenden Substanz bzw.

10 Substanzgemischen kultiviert wurden, wobei das Präparat eine erhöhte CD44-Expression dieser Zellen aufweist. An die so vorbehandelten Zellen wird dann Hyaluronsäure gebunden.

15 Diese Zellpräparate dienen der medizinischen Behandlung und/oder kosmetischen Anwendung. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung des Präparates.

Die Arthrose beginnt mit einer initialen Schädigung des Knorpelgewebes aufgrund verschiedener Ursachen. Dabei tritt neben einer Reduktion der Anzahl intakter Chondrozyten auch eine reaktive Synovialitis auf, welche ihrerseits sowohl zu pathologischen Veränderungen der Synovialflüssigkeit u.a. zur Abnahme der Konzentration und des Molekulargewichtes Hyaluronsäure führt, sowie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren bewirkt. Dies führt zu einer sekundären Knorpelschädigung und damit letztendlich zur Arthrose, welche neben dem Knorpelgewebe auch alle anderen Gelenkstrukturen betrifft. Es ist bekannt, dass intraartikulär applizierte Hyaluronsäure zur Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit, zur Schmerzreduktion, zur Hemmung der Entzündungsprozesse und unter in vitro Bedingungen zur Steigerung der Chondrozyten-Proliferation führt (K.Kawasaki et al. (1999) Hyaluronic acid enhances proliferation and chondroitin sulfate synthesis in cultured chondrocytes embedded in collagen gels. J Cell Physiol. 179:142-148; D.Wohlrab et al. (2000) Unterschiede in der Reaktion humaner Chondrozyten auf verschiedene Hyaluronsäurepräparate. hylan news. 2:2-5).

Die therapeutische Effektivität intraartikulär applizierter Hyaluronsäure ist von mehreren Faktoren abhängig. Bedingt durch die erhebliche Molekülgröße der Hyaluronsäure ($1- 6 \times 10^6$ Da) muss diese mehrfach gespalten werden, bevor sie den intraartikulären Raum verlassen und ab- bzw. in Knorpelgewebe eingebaut werden kann. Diese Spaltungsprozesse nehmen in Abhän-

gigkeit der Molmasse der Hyaluronsäure Stunden bis mehrere Tage in Anspruch. Dieser Prozess wird auch wesentlich durch die Fähigkeit von Chondrozyten gesteuert, über Rezeptoren Hyaluronsäure zu binden, wodurch für Hyaluronsäure im Vergleich zu anderen, niedermolekularen Substanzen (wie z. B. Lokalanästhetika) eine verlängerte intraartikuläre Verweildauer nachzuweisen ist.

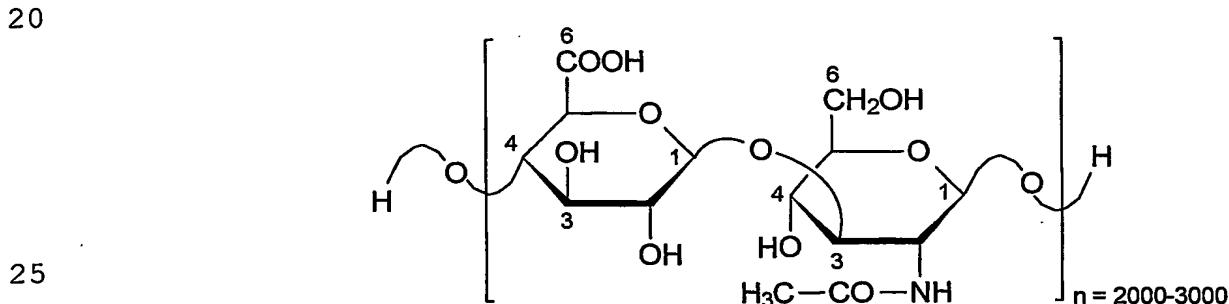
An der Oberfläche der Zellmembran von Chondrozyten werden die Matrixrezeptoren CD44 und/oder Integrine exprimiert. Beide Rezeptorfamilien spielen in der Homöostase des Gelenkknorpels eine zentrale Rolle. Insbesondere CD44 Rezeptoren, ein sehr variables und multifunktionelles Glykoprotein, wurde als der wesentlichste Zelloberflächenrezeptor für Hyaluronsäure erkannt (Proteins 39 (2000) 103-111). Der CD44-Rezeptor ist an der Oberfläche der Zellmembran vieler vieler humaner Zellen lokalisiert. Er ist ein Hyaluronsäure-bindendes, membraninterkalierendes Glycoprotein, welches mit Zytoskelettproteinen interaktiert. Es ist sowohl an der intrazellulären Signalweiterleitung als auch an einer Zell-Zell bzw. Zell-Matrix-Interaktion beteiligt. Der genaue Mechanismus dieser Vorgänge ist bisher nicht vollständig bekannt. CD44 besitzt eine hohe Affinität zur Hyaluronsäure. Geringere Affinitäten bestehen auch für Chondroitinsulfat und Heparansulfat.

Das CD44-Gen ist auf dem Chromosom 11 lokalisiert. Es besteht aus 20 Exons, davon werden immer 10 exprimiert (CD44H). Die anderen 10 kodieren extrazelluläre

Regionen (genannt v1-v10). Diese werden als unterschiedliche Splicevarianten bezeichnet. CD44-Isoformen sind in unterschiedlichen humanen Gewebearten (z.B. Tonsillen, Schilddrüse, Brust, Prostata, Cervix, Ösophagus, Epithel, Haut) nachgewiesen worden.

Auch an der Zellmembran humaner Chondrozyten wurde bereits der CD44-Rezeptor nachgewiesen. Die CD44-Expression der Chondrozyten im hyalinen Knorpelgewebe ist eine wesentliche Voraussetzung für die Bindung von Hyaluronsäure, wobei die Intensität der Hyaluronsäurebindung von der Anzahl, der Aktivierung und Intensität der Expression entsprechender Rezeptoren abhängig ist. Die im Knorpelgewebe gebundene Hyaluronsäure ist in der Lage, die entsprechenden Funktionen als Matrixbaustein zu erfüllen.

Die chemische Struktur der Hyaluronsäure (Hyaluronan) entspricht der Formel



30
Ungeachtet der positiven klinischen Erfahrungen mit hochmolekularer Hyaluronsäure bzw. deren Salzen (Molmasse $> 1 \times 10^6$ Dalton), ist die Kenntnis über den Wirkmechanismus bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gelenkknorpels unvollständig. Der bisherige

ge Wissenstand weist intraartikulär applizierte Hyaluronsäure als ein Schmier- und Gleitmittel aus.

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Hyaluronsäure intraartikulär entzündungshemmende Eigenschaften besitzt. Die bisherigen Ergebnisse die mit hochmolekularer Hyaluronsäure bzw. deren Salze erzielt wurden, sind jedoch in Bezug auf Regeneration der Gelenkstrukturen nicht befriedigend.

10

Somit bestand die Aufgabe, intraartikulär, intradiscal, subcutan oder intracutan anwendbare Zellpräparate zur Verfügung zu stellen, um eine verbesserte Regeneration von Gelenkstrukturen, insbesondere des Gelenkknorpels und/oder Gelenkfunktion und/oder Entzündungshemmung durch Hyaluronsäure und/oder deren Salze, verglichen mit der alleinigen Substitution der Hyaluronsäure, zu ermöglichen. Eine weitere Aufgabe besteht darin, ein geeignetes Verfahren zur Herstellung eines derartiges Präparates anzugeben.

15

Die Aufgabe wird in Bezug auf das Zellpräparat durch die Merkmale des Patentanspruches 1 und in Bezug auf die Verwendung durch die Merkmale des Anspruches 15 gelöst. Das Verfahren zur Herstellung des Zellpräparates ist durch die Merkmale der Ansprüche 19 bis 21 gekennzeichnet. Die Unteransprüche geben vorteilhafte Weiterbildungen an.

25

30 Erfindungsgemäß wird somit ein Zellpräparat zur therapeutischen und/oder kosmetischen Anwendung beim Menschen und/oder Tier vorgeschlagen, das humane oder

tierische Zellen enthält, die unter Zusatz einer die CD44 Expression dieser Zellen aktivierenden Substanz bzw. Substanzgemisch kultiviert wurden, wobei das Zellpräparat eine erhöhte CD44 Expression dieser Zellen aufweist. Dieses Zellpräparat zeigt ausgezeichnete Bindungseigenschaften für Hyaluronsäure, dessen Salze und/oder Fragment.

Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass ein derartiges Zellpräparat, das intraartikulär, intradiscal, subcutan oder intracutan angewendet werden kann, eine deutlich verbesserte Regeneration von Gelenkstrukturen verglichen mit der Hyaluronsäure und/oder dessen Salze zeigt.

Für das erfindungsgemäße Zellpräparat sind grundsätzlich alle humanen oder tierischen Zellen geeignet. Bevorzugt sind die Zellen autologen, allogen oder xenogenen Ursprungs. Der Erfinder konnte zeigen, dass es dabei besonders bevorzugt ist, wenn die Zellen Chondrozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und/oder Meniskuszellen sind. Die benutzten Zellen können aus Gewebe isoliert oder durch Differenzierungsvorgänge aus anderen Zellsystemen z. B. Stammzellen oder Fibroblasten erhalten werden.

Besonders bevorzugt ist es dabei, wenn im Falle von Chondrozyten diese aus dem Knorpelgewebe isoliert wurden. Im Falle von Keratinozyten ist es günstig, wenn diese aus der Epidermis isoliert werden. Wenn Meniskuszellen eingesetzt werden, können diese aus dem Meniskusgewebe isoliert werden. Selbstverständ-

lich können die vorstehend beschriebenen Zellen auch durch Differenzierungsvorgänge aus anderen Zellsystemen z. B. aus Stammzellen oder Fibroblasten erhalten werden.

5

Erfindungsgemäß umfasst die Erfindung bei der Hyaluronsäure auch dessen physiologisch verträgliche Salze sowie Spaltprodukte dieser Verbindungen. Die Erfindung schließt selbstverständlich auch Ausführungsformen ein, bei denen die Hyaluronsäure und die Spaltprodukte gemeinsam eingesetzt werden.

10

15

Es hat sich weiter gezeigt, dass es vorteilhaft ist, wenn der Anteil an der oder an den Verbindungen ausgewählt aus Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie den Spaltprodukten dieser Verbindungen von 0,001 bis 5,0 Gew.-% bezogen auf die gesamte galenische Formulierung beträgt.

20

25

30

Beim erfindungsgemäßen Zellpräparat ist es bevorzugt, wenn die Zellen Chondroitin sind. Selbstverständlich kann das Zellpräparat zusätzlich noch Chondroitinsulfat sowie Spaltprodukte dieser Verbindungen enthalten. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform sieht vor, dass beim Zellpräparat eine oder mehrere Bestandteile des physiologischen Knorpels (beispielsweise Glukosaminglykane oder Proteoglykane) enthalten sind. Auch ist es bevorzugt, wenn eine oder mehrere Substanzen mit Radikalfängereigenschaften enthalten sind. Beispiele hierfür sind Tocopherol oder Flavonoide. Weitere Substanzen die das Zellpräparat ent-

halten kann, sind eine oder mehrere Substanzen mit steroidale oder corticosteroidale Wirkung, eine oder mehrere nicht steroidale Antiphlogistika (auch nicht steroidale Antirheumatika), eine oder mehrere Analgetika, eine oder mehrere Substanzen mit hemmender Wirkung auf die Prostaglandinsynthese, insbesondere Lipoxigenasehemmer, Cyclooxygenasehemmer, Cyclooxygenasehemmer und Phospholipase A2-Hemmer, eine oder mehrere wachstumsstimulierende oder wachstumsregulierende Substanzen sogenannte Wachstumsfaktoren, eine oder mehrere Vitamine, eine oder mehrere Antioxidantien und/oder eine oder mehrere Substanzen mit wasserbindenden Eigenschaften.

Als die CD44-Expression von Zellen, insbesondere Chondrozyten aktivierende Substanz wird bevorzugt mindestens ein Lokalanästhetikum oder Derivate dieser Verbindung eingesetzt.

Das erfindungsgemäße Zellpräparat kann an und für sich in allen bekannten gängigen Formulierungen bereitgestellt werden. So ist es bevorzugt, das Zellpräparat in Form einer Matrix, einer Lösung, einer Suspension, einer Emulsion, einer Paste, einer Salbe, eines Gels, einer Creme oder einer Lotion oder eines Sprays anzuwenden.

Die Erfahrung betrifft weiterhin die Verwendung des vorstehend beschriebenen Zellpräparats zur therapeutischen und/oder kosmetischen Anwendung beim Menschen und/oder Tier.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des vorstehend beschriebenen Zellpräparats zur Herstellung eines Arzneimittels, insbesondere zur Herstellung eines Arzneimittels zur intraartikulären, intradiscalen, subcutanen, intracutanen oder epicutanen (topisch) Anwendung.

Bevorzugt ist es dabei, wenn das Zellpräparat zur Behandlung von degenerativen Erkrankungen menschlicher oder tierischer Gelenke angewendet wird.

Nachfolgend sind einige spezifische Verwendungen von ausgewählten Zellpräparaten angegeben.

- die Verwendung von einer oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus humanen Chondrozyten oder anderen humanen oder tierischen Zellen, Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie den Spaltprodukten dieser Verbindungen und eine die CD44 Expression von Chondrozyten aktivierende Substanz oder Substanzgemischen, bevorzugt ein Lokalanästhetikum oder mehreren Lokalanästhetika oder den Derivaten dieser Verbindungen zur Herstellung eines intraartikulär, intradiscal, subcutan oder intracutan anwendbaren Zellpräparates,
- die Verwendung von einer oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus humanen Chondrozyten oder anderen humanen oder tierischen Zellen, Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie Spaltprodukten dieser

Verbindungen und von einer die CD44 Expression von Chondrozyten aktivierende Substanz oder Substanzgemisch zur Steigerung der humanen und/oder tierischen Chondrozytenproliferation,

5

- die Verwendung von einer oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus humanen Chondrozyten oder anderen humanen oder tierischen Zellen, Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie Spaltprodukten dieser Verbindungen und von einem Lokalanästhetikum oder mehreren Lokalanästhetika oder den Derivaten dieser Verbindungen zur Veränderung der CD44-Rezeptorexpression

10

- die Verwendung von einer oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus humanen Chondrozyten oder anderen humanen oder tierischen Zellen, Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie Spaltprodukten dieser Verbindungen und von einem Lokalanästhetikum oder mehreren Lokalanästhetika oder den Derivaten dieser Verbindungen zur Stabilisierung und/oder Regeneration von einzelnen oder mehreren Gelenkstrukturen, insbesondere des Gelenkknorpels und der Menisken,

20

- die Verwendung von einer oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus humanen Chondrozyten oder anderen humanen oder tierischen Zellen, Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie Spaltprodukten dieser

25

30

Verbindungen und von einem Lokalanästhetikum oder mehreren Lokalanästhetika oder den Derivaten dieser Verbindungen zur Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit,

5

- die Verwendung von einer oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus humanen Chondrozyten oder anderen humanen oder tierischen Zellen, Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie Spaltprodukten dieser Verbindungen und von einem Lokalanästhetikum oder mehreren Lokalanästhetika oder den Derivaten dieser Verbindungen zur Hemmung von Entzündungsprozessen,

10

- die Verwendung von einer oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus humanen Chondrozyten oder anderen humanen oder tierischen Zellen, Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie Spaltprodukten dieser Verbindungen und von einem Lokalanästhetikum oder mehreren Lokalanästhetika oder den Derivaten dieser Verbindungen zur Verbesserung der Schmerzreduktion.

15

Die Anwendung des erfindungsgemäßen Zellpräparates kann sowohl am Menschen als auch an Tieren erfolgen. Die erfindungsgemäßen Zellpräparate können sowohl in der Human- und in der Veterinärmedizin angewendet werden. Die Anwendungsgebiete der erfindungsgemäßen Zellpräparate betreffen die Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe von Gelenkknorpel-, Knochen- und

20

25

Knorpelknochendefekten, Meniskus- und Bandscheibenläsionen sowie andere Knorpeldefekte (z.B. Nasen- und Ohrknorpel) auch unter kosmetischen Gesichtspunkten.

5 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung des vorstehend beschriebenen Zellpräparats. Erfindungsgemäß werden danach humane oder tierische Zellen unter Zusatz einer die CD44 Expression dieser Zellen aktivierenden Substanz bzw. Substanzge-
10 misch hiervon kultiviert. Wesentlich ist nun, dass die CD44-Rezeptorexpression nur für eine bestimmte Zeit überproportional gesteigert wird. Es hat sich gezeigt, dass bei einer Zeitspanne für die Kultivierung der Zellen von 6 bis 15 Tage, bevorzugt 9 bis 11 Tage, ganz besonders bevorzugt nach 10 Tagen die
15 CD44-Rezeptorexpression innerhalb von 12 bis 72 Stunden am besten ist. Innerhalb dieser Zeitspanne sind 24 bis 48 Stunden besonders günstig. Die Zellen besitzen während dieser Zeitspanne offensichtlich besonders viele freie Rezeptoren für CD44, so dass sie sich gut an die Hyaluronsäure binden.

20

Gegebenenfalls können weitere Wirk-Hilfe- und/oder Trägerstoffe zugesetzt werden um eine geeignete Formulierung zu erhalten. Nachfolgend sind geeignete Verfahren angegeben.

25

- Herstellung eines intraartikulär, intradiscal, subcutan oder intracutan anwendbaren Zellpräparates, wobei man humane Chondrozyten oder andere humane oder tierische Zellen, eine oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus Hyaluronsäure, den

30

physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie den Spaltprodukten dieser Verbindungen und eine die CD44 Expression von Chondrozyten aktivierende Substanz oder Substanzgemischen gegebenenfalls mit weiteren Wirkstoffen, Hilfs- und/oder Trägerstoffen in ein geeignetes Zellpräparat bringt.

5

- 10 - Herstellung eines intraartikulär, intradiscal, subcutan oder intracutan anwendbaren Zellpräparates, wobei man humane Chondrozyten oder andere humane oder tierische Zellen, eine oder mehrere Verbindungen ausgewählt aus Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie den Spaltprodukten dieser Verbindungen und eine die CD44 Expression aktivierende Substanz bzw. Substanzgemischen und über den pH-Wert der Formulierung eine optimale Bindung der Zellen an Hyaluronsäure bzw. der Hyaluronsäure 15 an die Zellen und/oder den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure und/oder den Spaltprodukten dieser Verbindungen erreicht.

20

25

Die Erfindung soll an einem konkreten Beispiel erläutert werden, ohne sie darauf zu beschränken:

Beispiel 1:

Beeinflussung der CD44-Rezeptorexpression humaner Chondrozyten durch Lidocain

5 Herstellung

Lidocainhydrochlorid (Universitätsapotheke der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) lag primär in Pulverform vor. Dieses wurde in entsprechender Menge in RPMI-Medium (Seromed, Berlin) gelöst, sodass eine Endkonzentration von 0,1 mmol/l Lidocain vorlag. Anschließend erfolgte die Sterilfiltration. Die Substanzzugabe zur Zellkultur erfolgte beim letzten Mediumwechsel am 10. Kulturtag.

15

Präparation des biologischen Materials

Die Untersuchungen erfolgten an humanen Chondrozyten, welche aus arthrotisch verändertem Kniegelenksknorpel isoliert wurden. Das Knorpelgewebe entstammte den bei der Implantation von Kniestalendoprothesen resizierten femoralen Gelenkflächen. Es wurde ausschließlich arthrotisch verändertes Knorpelgewebe von drei verschiedenen Patienten ohne bekannte relevante Nebenerkrankungen, insbesondere ohne rheumatoide Arthritis, verwandt.

Die intraoperativ gewonnenen Knochen-Knorpelfragmente wurden zunächst in steriles L15 Medium (Seromed, Berlin) als Transportmedium überführt. Anschließend erfolgte unter sterilen Bedingungen die Ablösung des Knorpelgewebes vom subchondralen Knochen mittels

30

Skalpell sowie eine scharfe Durchtrennung des Gewebes in ca. 1mm³ große Stücke. Die enzymatische Isolierung der Chondrozyten aus den Knorpelstücken erfolgte mittels Pronase und Kollagenase A (Boehringer Mannheim) über eine Zeitspanne von 16 Stunden.

5

Versuchsbedingungen

10

Die isolierten Chondrozyten wurden in Zellkulturflaschen in RPMI-Medium (Seromed, Berlin) unter Zusatz verschiedener Antibiotika bei 37°C und 5% Kohlendioxid im Brutschrank als Monolayerkultur kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Am 10. Kulturtag erfolgte letzmalig ein Mediumwechsel. Hier erfolgte die Zugabe von Lidocain im Zellkulturmedium in einer Konzentration 0,1 mmol/l. Zusätzlich wurde jeweils eine unbehandelte Chondrozytenpopulation als Kontrolle mitgeführt. Die Kulturdauer betrug 11, 12 bzw. 13 Tage.

15

20

Versuchsdurchführung

25

Der Nachweis des CD44-Membranproteins bei humanen Chondrozyten erfolgte 24, 48 bzw. 72 Stunden nach Zugabe des Lidocains flowzytometrisch durch Vergleich mit der Isotypkontrolle (ms-IgG1-FITC, Mouse IgG1, DAKO Diagnostika GmbH, Mannheim). Dabei wurde die Anzahl der merkmalstragenden Zellen gegen die Fluoreszenzintensität des FITC-konjugierten CD44-Antikörpers (anti-CD44H-FITC, DAKO) aufgetragen.

30

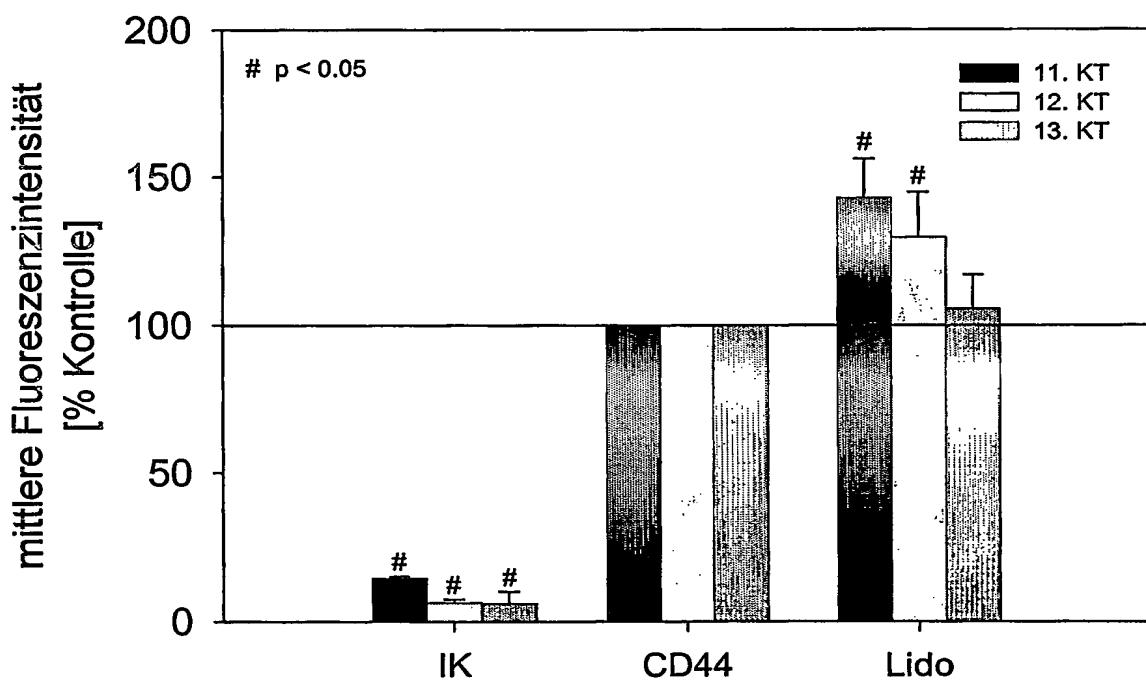
Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Fig. 1 dargestellt.

Fig. 1:

Flowzytometrische Bestimmung der CD44-Rezeptorexpression humaner in vitro kultivierter Chondrozyten unter dem Einfluss von 0,1 mmol/l Lidocain in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Zugabe von Lidocain am 10. Kulturtag. (N=5) (# signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (CD44), $p<0,05$)

5

10



Patentansprüche

1. Zellpräparat zur therapeutischen und/oder kosmetischen Anwendung beim Menschen und/oder Tier
5 enthaltend humane oder tierische Zellen, die unter Zusatz einer die CD44 Expression dieser Zellen aktivierenden Substanz bzw. Substanzgemischen kultiviert wurden, an die Hyaluronsäure und/oder deren physiologisch verträgliche Salze und/oder Spaltprodukte hiervon gebunden sind.
- 10
2. Zellpräparat nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil an der oder an den Verbindungen ausgewählt aus Hyaluronsäure, den physiologisch verträglichen Salzen der Hyaluronsäure sowie den Spaltprodukten dieser Verbindungen von 0,001 bis 5,0 Gew.-% bezogen auf die gesamte Formulierung beträgt.
- 15
- 20
3. Zellpräparat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die die CD44-Expression der Zellen aktivierende Substanz mindestens ein Lokalanästhetikum und/oder ein Derivat und/oder eine Mischung hiervon ist.
- 25
4. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die benutzten Zellen autologen, allogen, oder xenogenen Ursprungs sind.
- 30

5. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen Chondrozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und/oder Meniskuszellen sind.

5

6. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen aus Gewebe isoliert wurden, oder durch Differenzierungsvorgänge aus anderen Zellsysteme entstanden sind.

10

7. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Chondrozyten enthalten sind, die aus dem Knorpelgewebe isoliert wurden oder durch Differenzierungsvorgänge aus anderen Zellsystemen entstanden sind.

15

8. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Keratinozyten enthalten sind, die aus der Epidermis isoliert wurden, oder durch Differenzierungsvorgänge aus anderen Zellsystemen entstanden sind.

20

9. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Fibroblasten enthalten sind, die isoliert wurden, oder durch Differenzierungsvorgänge aus anderen Zellsystemen entstanden sind.

25

10. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden An- sprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Meniskuszellen enthalten sind, die aus dem Meniskusgewebe isoliert wurden, oder durch Differenzierungs- 5 vorgänge aus anderen Zellsystemen entstanden sind.

10. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden An- sprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich Chondroitin, Chondroitinsulfate sowie Spaltprodukte in dieser Verbindungen enthalten sind. 15

12. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden An- sprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich ein oder mehrere Bestandteile des physiologi- schen Knorpels enthalten sind. 15

13. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden An- sprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich 20 eine oder mehrere Substanzen mit Radikalfänger- eigenschaften, eine oder mehrere Substanzen mit steroidaler oder corticosteroidaler Wirkung, ei- ne oder mehrere nichtsteroidale Antiphlogistika, eine oder mehrere Analgetika, eine oder mehrere Substanzen mit hemmender Wirkung auf die Prosta- glandinsynthese, insbesondere Lipoxygenasehem- mer, Cyclooxygenasehemmer und Phospholipase A2- Hemmer, eine oder mehrere wachstumsstimulierende oder wachstumsregulierende Substanzen (sogenann- te Wachstumsfaktoren), eine oder mehrere Vitami- ne, eine oder mehrere Antioxydantien und/oder 25 eine oder mehrere Substanzen mit wasserbindenden 30

Eigenschaften enthalten sind.

14. Zellpräparat nach einem der vorhergehenden An- sprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es bevor-

5 zugt in Form einer Matrix, einer Lösung, einer Suspension, einer Emulsion, einer Paste, einer Salbe, eines Gels, einer Creme, einer Lotion oder eines Sprays vorliegt.

10 15. Verwendung eines Zellpräparates nach einem der vorhergehenden Ansprüche, zur therapeutischen und/oder kosmetischen Anwendung beim Menschen und/oder Tier.

15 16. Verwendung eines Zellpräparates nach einem der Ansprüche 1 bis 15, zur Herstellung eines Arz- neimittels.

20 17. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch zur Herstellung eines intraartikulär, intradiscal, subcutan, intracutan oder epicutan (topisch) an- wendbaren Transplantates.

25 18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, zur Behandlung von degenerativen Erkrankungen menschlicher oder tierischer Gelenke, insbeson- dere zur Behandlung von traumatischen Erkrankun- gen aller menschlichen oder tierischen Gelenke, zur Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe von Gelenkerkrankungen und von Gelenkfunktions- störungen, zur Therapie, Prophylaxe und/oder Me- taphylaxe von Gelenkknorpel- und Knorpelknochen-

defekten, zur Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe von Meniskus- und Bandscheibenerkrankungen, zur kosmetischen und/oder therapeutischen Behandlung von extraartikulären Knorpeldefekten und/oder zur Therapie, Prophylaxe und/oder Metaphylaxe von Gewebedefekten des Hautorgans zur medizinischen und/oder kosmetischen Anwendung.

5

10 19. Verfahren zur Herstellung einer Zellpräparation nach einem der Ansprüche 1 bis 14, indem humane oder tierische Zellen, unter Zusatz einer die CD44-Expression dieser Zellen aktivierenden Substanz bzw. Substanzgemischen kultiviert und an diese so vorbehandelten Zellen Hyaluronsäure und/oder deren physiologisch verträgliche Salze und/oder Spaltprodukte hiervon bindet.

15

20 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Kultivierung der Zellen über eine Zeitspanne von 6 bis 15, bevorzugt 9 bis 11 Tagen erfolgt und dann die die CD44-Expression aktivierende Substanz gesetzt wird.

25 21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass man 12 bis 72 Stunden, bevorzugt 24 bis 48 Stunden nach Zugabe der die CD44-Expression der Zellen aktivierende Substanz, die Hyaluronsäure und/oder deren Salze und/oder deren Fragment bindet.

30